

# 구강편평상피세포암 조직에서의 Microsatellite 불안정성 및 p53 유전자 돌연변이 분석

최태호 · 정운복\* · 홍수형\* · 김진아\* · 나선영\* · 장현중 · 손윤경\*\* · 김진수 · 김정완\*  
 경북대학교 치과대학 구강악안면외과학교실, 구강미생물교실\*, 의과대학 병리학교실\*\*

## Abstract

### MICROSATELLITE INSTABILITY AND p53 GENE MUTATION IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Tae-Ho Choi, Woon-Bok Chung\*, Su-Hyung Hong\*, Jin-A Kim\*, Sun-oung Na\*,  
 Hyun-Jung Jang, Yoon-Kyung Sohn\*\*, Chin-Soo Kim, Jung-Wan Kim\*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery,*

*Department of Dental Microbiology\*, College of Dentistry,*

*Department of Pathology\*\*, College of Medicine, Kyungpook National University. Taegu. Korea*

Germ-line mutations at DNA repair loci confer susceptibility to colon cancer in hereditary non-polypopsis colorectal cancer. Somatic loss of DNA mismatch repair gene has been reported in a large variety of other tumor types. Replication errors(RERs) judged by microsatellite instability(MSI) and its associated mutations have been recognized as an important mechanism in various tumor types.

To investigate associations between MSI and oral squamous cell carcinoma, the frequency of MSI using 12 microsatellite markers were analyzed for the series of oral tumors. Of 17 tumors, 8 cases(47%) did not show instability at any of the 12 loci; 5(29%) showed instability at 2~3 loci; and 4(24%) showed instability above 4 loci.

The 4 cases showing widespread MSI did not differ from those without evidence of instability in terms of age at diagnosis, degree of differentiation, metastasis to lymph node, tumor location or the presence of mutations in the p53 tumor suppressor gene. DCC and D17S 796 were the most frequently detected in MSI analysis.

There were no correlation between smoking and MSI frequency, instead, smoking was suggested to increase the mutation rate of p53 and development of oral carcinomas.

**Key words :** Microsatellite instability(MSI), Oral squamous cell carcinoma, p53

## I. 서 론

구강암은 전세계적으로 6번째의 발병률을 보이는 암으로서, 90% 이상이 편평상피세포암(squamous cell carcinoma)이다<sup>1)</sup>. 구강암에 대한 처치가 빠르게 개선되고는 있지만 아직도 생존율의 향상에 현저히 기여하지는 못하는 실정이다. 현재까지 구강암의 악성도 평가 및 예후 측정의 지표로서 주로 임상적 소견과 더불어 병리조직학적 소견에 의한 평가방법이 이용되고 있으나, 이러한 결과가 예후 판정과 일치하지 않는 경우가 종종 있다. 이는 발암기전의 다양성 및 다단계 발암과정 등의 이유로 병소의 조기진단 및 정확한 예후측정 등에 어려움이 있기 때문이다.

구강암 암화단계의 시작이 흡연 및 음주와 밀접한 관련이 있다

는 사실은 역학조사 결과 이미 밝혀졌지만<sup>2,3)</sup> 분자유전학적 현상과의 연관성에 대해서는 아직 확인되지 않았다. 그러나 모든 종양에 있어서 암화과정의 초기에 어떤 유전자의 변이를 인지할 수 있다면, 좀 더 정확한 조기진단 및 더욱 효과적인 치료방법의 개발이 가능하게 될 것이다.

1993년 microsatellite instability(MSI)가 폐암의 발병에 중요한 역할을 하고, 특히 hereditary nonpolypopsis colorectal syndrome(HNPCC)과 밀접한 연관이 있다는 사실이 알려지면서 종양 생물학에 새로운 장이 열렸다. MSI는 DNA mismatch repair(MMR) system의 결함으로 인해 염색체에 널리 분포하는 반복적인 microsatellite sequence의 길이가 변하는 현상이다. 현재에는 MSI를 MMR mutator phenotype으로 나타내기도 하는데<sup>4)</sup>, 이로 인하여 원종양유전자 또는 종양억제유전자에 유전적 변이가 일어나 세포의 성장이 조절되지 않고 계속 증식하는 것으로 추정되고 있다.

지난 6년간의 연구결과, MSI 현상은 폐암과 HNPCC에만 국한된 것이 아니라 여러 종양의 발생에 폭넓게 관여할 것이라는 추정이 일반적인 사실로 받아들여지고 있지만 아직 이를 뒷받침할

### 김 정 완

대구광역시 중구 동인2가 101번지  
 경북대학교 치과대학 구강미생물교실

### Jung-Wan Kim

Dept. of Dental Microbiology, College of Dentistry, Kyungpook National University  
 101, Dong In-Dong, Taegu 700-422, Korea  
 Tel: 82-53-420-6811 Fax: 82-53-442-6596

※ 본 논문은 1997년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 연구되었음.

만한 확실한 연구결과는 빈약한 실정이다. 이에 저자는 구강암의 암화 과정과 MSI의 상관관계에 대해 알아보고, 나아가 조기진단 및 예방과 치료에 도움이 되고자 구강평평상피세포암 17례에서 종양억제유전자 p53, DCC, APC 등이 위치하는 유전좌와 인접 유전좌를 포함한 열두 부위를 대상으로 구강암 조직과 정상조직에서 MSI분석을 행하였다. 또한 대표적인 종양억제유전자인 p53 단백질의 발현정도를 면역조직화학법을 이용하여 조사하였으며, 아울러 p53 유전자의 exon 부위 중 90% 이상의 돌연변이가 분포하는 것으로 알려진 exon 5, 6, 7, 8을 대상으로 polymerase chain reaction-single stranded conformation polymorphism(PCR-SSCP) 분석을 시행하여 비정상적인 band가 관찰될 경우 염기서열을 분석하여 돌연변이 양상을 조사하였다.

## II. 대상 및 방법

### 1. 대 상

1997년 1년 간 경북대병원 구강악안면 외과에서 수술한 구강암환자 중 항암요법이나 방사선치료를 받지 않은 환자 17례를 대상으로 하였다. 암 조직은 적출하여 액체질소에 급랭한 후 DNA를 추출하기 전까지 -70°C 초저온냉동고에 보관하였다. 유전자 변이를 확인하기 위한 대조군으로는 구강암환자의 수술시 암조직 주위의 정상 점막조직을 취하여 사용하였다. 면역조직화학적 검사는 파라핀 조직편을 사용하였다.

### 2. 면역조직화학적 검사

5µm 두께의 조직이 포매된 파라핀 절편에 일차항체인 p53 단세포균 항체인 DO 7(DAKO)을 37°C 에서 한시간 반응시킨 후 결과를 확인하였다. 이때 각 시료는 환자 당 3장의 slide를 이용하여 결과가 일치하는 경우만 보고하였다.

염색된 슬라이드의 전체 시야를 관찰한 후 양성 반응이 전혀 없는 경우를 음성(-)으로 하고, 양성세포의 수가 1~25% 까지를 등급 1(+), 25~50% 는 등급 2(++), 그 이상은 등급 3(+++)으로 하였다.

### 3. Genomic DNA의 분리

냉동상태의 조직 중 종양세포가 50% 이상인 부위만을 현미경 관찰 하에서 선별하여 다음과 같이 genomic DNA를 분리하였다. 조직을 homogenizer로 파쇄 후 100mg의 조직당 1ml의 extraction solution[10mM Tris-Cl (pH 8.0), 0.1mM EDTA(pH 8.0), 20µg/ml pancreatic RNase, 0.5% SDS]을 넣고 37°C에서 한 시간 정치한 후 다시 30µl의 Proteinase K(20mg/ml)를 첨가하여 50°C 항온 수조에서 3 시간동안 반응시켰다. 반응물을 phenol-chloroform으로 정제 한 후 10mM ammonium acetate와 isopropanol을 첨가하여 침전시키고 마지막으로 TE buffer에 녹인 후 흡광도를 측정하여 A260/A280이 1.8 이상인 것을 사용하였다.

### 4. PCR-SSCP 및 염기서열 분석

p53을 coding하는 유전자 중 유전자 변이가 집중되어 있는 부분인 exon 5-8 부위에 적합한 primer를 사용하였다. 각 primer는 (주)바이오니아(한국)에 의뢰하여 합성, 정제하고 25pM 농도로 희석하여 사용하였으며, 사용된 primer의 염기배열과 증폭되는 대상 염기배열 (target sequence)의 크기는 Table 1과 같다.

PCR-SSCP를 위한 증합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR reagent kit(Perkin Elmer)를 사용하여 제조사의 추천방법에 따라 시행하며, Perkin-Elmer 2400 증합효소 연쇄 반응기에서 증폭된 DNA에 대해 single stranded conformation polymorphism(SSCP)을 조사하였다<sup>5,7).</sup>

SSCP 분석결과 정상점막조직과 비교하여 암 조직에서 이상 band가 보이는 시료에 대해서는 *fmo*ITM DNA sequencing kit(Promega)를 사용하여 제조사의 추천 방법에 따라 direct thermocycle sequencing을 시행하였다. 반응이 끝난 후 8% 8M urea-polyacrylamide gel에 65W 전력으로 gel의 온도를 40~60°C로 유지하면서 3시간 정도 전기영동하고 gel dryer로 1시간 건조시킨 다음 X-ray 필름에 12~36시간 노출한 후 현상하여 염기서열을 분석하였다.

### 5. Microsatellite 분석 및 결과 해석

암 조직 염색체의 불안정성을 조사하기 위하여 종양관련 유전자 내에 위치하는 12부위의 microsatellite에 대해 PCR을 실시하였다. 사용한 MSI marker의 종류 및 그 특징은 Table 2와 같다. 한 쌍의 primer 중 Sense 또는 antisense 가닥을  $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP로 표지하여 PCR 한 후 7% polyacrylamide gel에서 전개하여 autoradiography로 분석하였다. 그 결과 정상조직의 DNA와 비교하여 암 조직의 DNA에서 추가적인 band가 더 관찰될 때 MSI로 결정하였다. 이때 적어도 사용된 marker의 30% 이상에 대해 MSI가 나타나면 wide-spread MSI(MSI-H), 그 이하의 loci에 대해서만 MSI가 나타나면 low-level MSI(MSI-L), 그리고 MSI가 전혀 나타나지 않으면 microsatellite stable(MSS)로 분류하였다<sup>8).</sup>

**Table 1.** Primer Sets Used in PCR-SSCP and Direct Sequence Analyses

Sites	Sequences(5' → 3')	Sense/ Antisense	Product size(bp)
p53 Exon5	TGC CCT GAC TTT CAA CTC TGT	S	260
	ACC AGC CCT GTC GTC TCT C	As	
Exon6	ACG ACA GGG CTG GTT GCC CA	S	204
	CTC CCA GAG ACC CCA GTT GC	As	
Exon7	GTG TTG TCT CCT AGG TTG GC	S	139
	CAA GTG GCT CCT GAC CTG GA	As	
Exon8	CTG CCT CTT GCT TCT CTT TT	S	204
	TCT CCT CCA CCG CTT CTT GT	As	

**Table 2.** Microsatellite Loci Analyzed

Locus Symbol	Chromosome	Genes	Repeats	Sequences(5' → 3')
D5S107	5p	APC/MCC	(CA)n	GAT CCA CTT TAA CCC AAA TAC (S) GGC ATC AAC TTG AAC AGC AT (AS)
D9S63	9q terminal	.	(CA)n	CCG GAA GTT ACT CTA GTC TA (S) TTA TAA TGC CGG TCA ACC TT (AS)
D17S261	17p12	.	(CA)n	CAG GTT CTG TCA TAG GAC TA (S) TTC TGG AAA CCT ACT CCT GA (AS)
D17S513	7p terminal-q terminal	p53	(CA)n	TTC ACT TGT GGG CTG CTG TC (S) TAA GAA AGG CTC CCA CAA GCA (AS)
D17S796	17p terminal-q terminal	p53	(CA)n	CAA TGG AAC CAA ATG TGG TC (S) AGT CCG ATA ATG CCA GGA TG (AS)
TP53	17p13	p53	(CA)n	ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C (S) AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG (AS)
D9S126	9p21	p16	(CA)n	ATTGA AACTC TGCTG AATTT TCTG (S) CAACT CCCTC TTGGG AACTG C (AS)
D9S162	9p21	p16	(CA)n	AAT TCC CAC AAC AAA TCT GCA ATG ACC AGT TAA GGT TC
DCC	18q21	DCC	(TA)n	GAT GAC ATT TTC CCT CTA GA (S) TTT AGT GGT TAT TGC CTT GAA (AS)
IGF-IIR	6q26-27	IGF-IIR	(G)8	GCA GGT CTC CTG ACT CAG AA (S) GAA GAA GAT GGC TGT GGA GC (AS)
TGF-β RII	3p21.3-22	TGF-β	RII	(A)10 CCT CGC TTC CAA TGA ATC TC (S) TGC ACT CAT CAG AGC TAC AGG (AS)
IFN-αR	9p22	IFN-αR	(TG)n	TGC GCG TTA AGT TAA TTG GTT (S) GTA AGG TGG AAA CCC CCA CT (AS)

**Table 3.** Clinico-pathological Features, Risk Factors for OSCC and Results of MSI, Immunohistochemistry and Mutation analysis of p53

Case	Sex	Age (Years)	Site	Histo-pathology	Meta-stasis	Smoking	Alcohol	Number MSI	p53	
									IHC	Mutation site
K-1	F	43	SP	W	-	No	No	0	-	
K-2	M	63	SP	P	-	Yes	Yes	4	-	
K-3	M	57	G	M	+	Yes	Yes	5	+++	exon7 Codon 248 Arg→Gly
K-4	M	44	SP	W	-	Yes	Yes	2	-	exon5 Codon 136: Gln→STOP
K-5	M	58	G	M	+	Yes	Yes	3	-	exon5 Codon 169: insertion & deletion exon8: splicing miss
K-6	M	50	SP	M	-	Yes	Yes	5	++	exon5 Codon 159: GCC → GC exon7 Codon 247: 4 bp addition
K-7	M	60	T	M	+	Yes	Yes	0	-	exon5 Codon 181: 14 bp deletion
K-8	M	71	G	W	+	No	No	7	+++	exon8 Codon 287: Glu→Asp
K-9	F	66	FOM	W	-	No	No	1	-	
K-10	M	61	T	M	+	Yes	Yes	2	+++	
K-11	M	67	BM	W	-	Yes	Yes	3	-	
K-12	F	77	T	W	-	Yes	No	0	-	
K-13	M	59	T	W	+	Yes	Yes	0	-	
K-14	M	56	BM	W	+	No	Yes	0	-	
K-15	M	63	FOM	W	UI	UI	UI	0	-	
K-16	M	41	T	M	+	Yes	Yes	0	+	
K-17	F	68	BM	W	-	No	No	0	++	exon7 Codon 259: Arg→Ser

Abbreviations: SP, soft plate; G, Gingiva; T, tongue; FOM, floor of mouth; BM, bmbuccal mucosa; W, well differentiated; M, moderately differentiated; P, poorly differentiated; -, Negative; +, Positive; UI, uninformative

### III. 성 적

본 실험의 연구대상인 17례의 구강 편평상피세포암(Oral Squamous Cell Carcinoma: OSCC) 환자의 임상병리학적 소견을 표 3에 정리하였다. 남자가 13례, 여자가 4례였으며 평균연령은 59세였다. 발생부위는 연구개 4례, 치은 3례, 설부 5례, 구강저 2례, 협점막 3례로 나타났다. 병리학적 분화도는 고분화가 10례, 중분화가 6례, 저분화가 1례였으며, 조직학적으로 임파선 전이가 확인된 환자는 8례였다. 그리고 남자환자 13명 중 10명이 흡연과 음주기간이 최소한 20년 이상이었다. 이들 17명의 구강암 환자를 대상으로 p53 단백질의 과발현 유무를 면역조직화학법으로 검사한 결과 Fig. 1, Table 3과 같이 나타났다. 총 17례의 OSCC 중 6례(35%)에서 강한 과발현이 관찰되었다. 이들 중 전이가 되지 않았

거나 분화도가 좋은 경우(각각 2/6, 33%) 보다는, 전이가 되었거나 분화도가 보통인 경우(각각 4/6, 67%)에서 p53 과발현이 더 많이 나타났다(Table 3).

PCR-SSCP분석에서 band 이동의 이상이 관찰된 시료를 대상으로 염기서열을 분석하여 p53 유전자의 돌연변이 양상을 조사하였다. Fig.2A는 K6 환자의 exon5의 159번 codon에서 한 base pair의 결손에 의해 frame shift mutation이 일어난 결과이며, Fig.2B는 K5 환자의 intron 7과 exon 8사이에서 splicing miss가 관찰된 사진이다. Exon 5, exon 7, exon 8에서는 nonsense mutation, missense mutation, frame shift mutation, splicing miss 등의 돌연변이가 관찰되었으나, exon 6에서는 전혀 관찰되지 않았다(Table 3).

17례의 구강암 환자 정상조직과 암조직 DNA의 microsatellite repeats 부위에 대한 유전자 불안정성을 조사한 결과 Table 3과

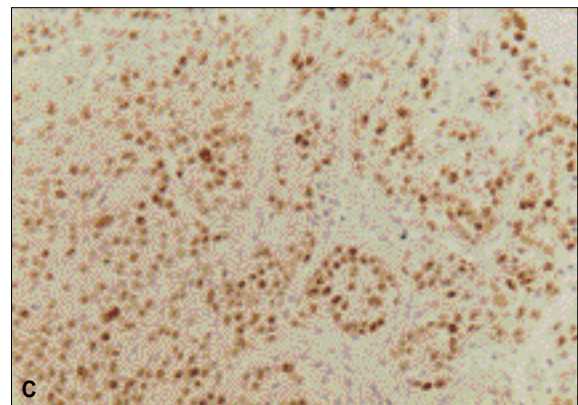
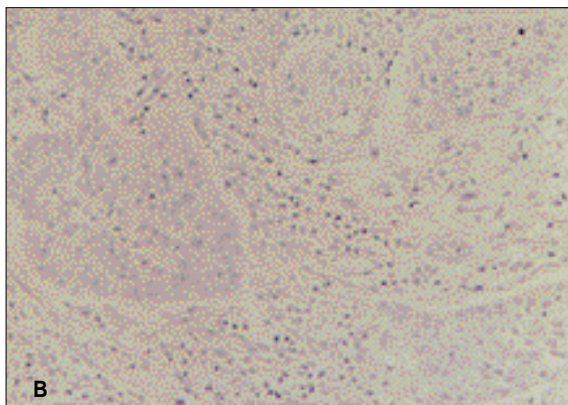
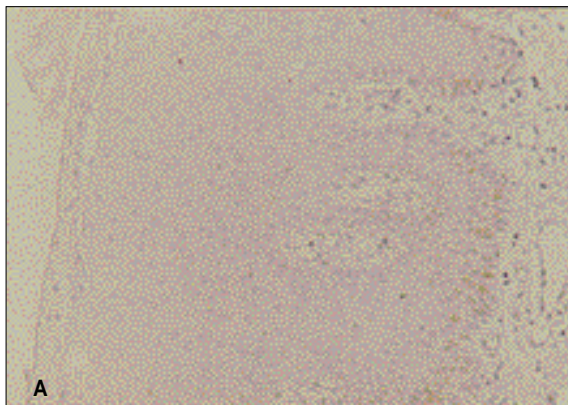
**Table 4.** Frequency of MSI in Oral Squamous Cell Carcinoma

Total (%)	MSI-H <sup>1</sup> (%)	MSI-L <sup>2</sup> (%)	MSS <sup>3</sup> (%)
17 (100)	4 (24)	5 (29)	8 (47)

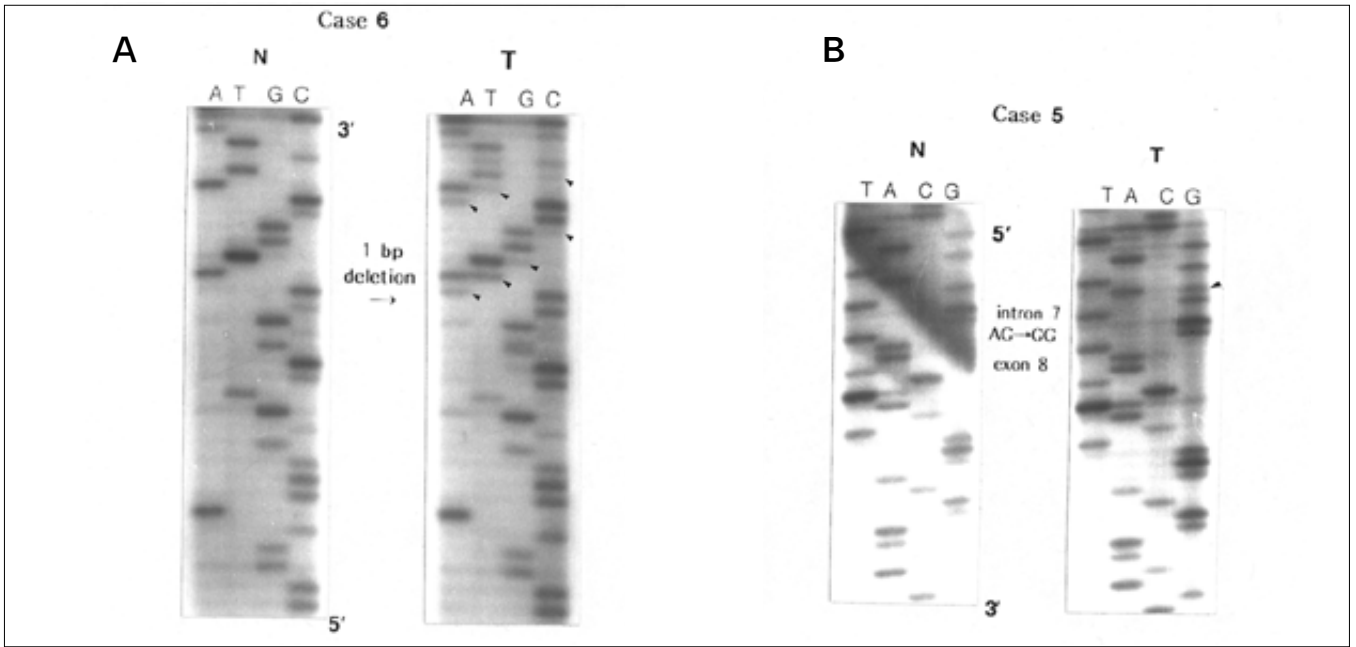
1. over than 30-40% of investigated loci had MSI
2. less than 30-40% of investigated loci had MSI
3. none of investigated loci had MSI

**Table 5.** Microsatellite Loci Analyzed and Frequency of MSI

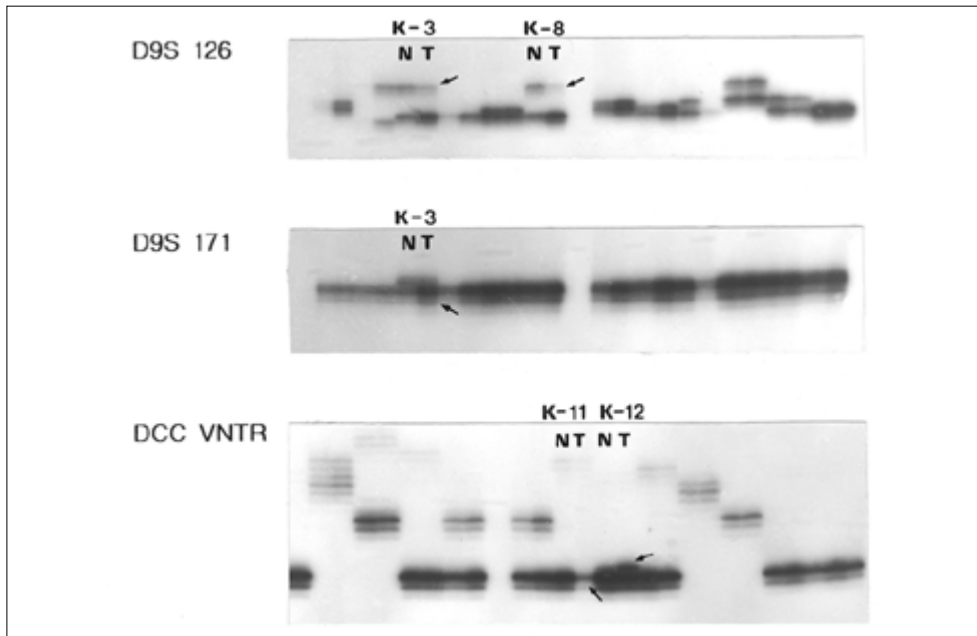
Locus Symbol	No. Tumors with MSI (%) (n=17)
D5S107	3 (18)
D9S63	3 (18)
D17S261	3 (18)
D17S513	3 (18)
D17S796	5 (29)
TP53	3 (18)
D9S126	2 (12)
D9S162	3 (18)
DCC	5 (29)
IGF-IIR	0 (0)
TGF-βRII	0 (0)
IFN-αR	2 (12)



**Fig. 1.** Immunohistochemical staining of p53 protein in tumor cell nuclei of an oral squamous cell carcinoma. A, normal tissue ; B, negative expression of p53 protein ; C, overexpression of p53 protein.



**Fig. 2.** Identification of p53 mutation in oral squamous cell carcinoma by direct sequencing. A showed a frame shift mutation by 1bp deletion in exon 5 and B showed a splicing miss between intron 7 and exon 8. N, normal tissue ; T, tumor tissue.



**Fig. 3.** Microsatellite instability analyses of OSCC.

In each cases, the PCR products of normal(N) and tumor(T) DNA are presented in pairs.

같이 나타났으며, 그 예를 Fig. 3에 제시하였다. 본 실험에 사용된 12종류의 marker에 대해 MSI-H는 4례(24%), MSI-L은 5례(29%)였다. MSI와 환자의 임상병리학적 특징에 대해 살펴보면 분화도가 좋은 경우보다는 그렇지 않은 경우 상대적으로 MSI-H가 빈번하게 나타났으며 그 외 종양의 위치, 전이여부 등과는 연관이 없는 것으로 나타났다. 한편 MSI-H의 3/4에서 p53 과발현이 관찰되었

고, 모든 MSI-H에서 p53 exon 7 또는 exon 8에서 돌연변이가 있음이 확인되었다.

각 marker별로 MSI-positive를 살펴보면 D17S796과 DCC(18q21)에 대해 모두 5례(5/17= 29%)에서 비교적 높은 빈도로 MSI가 관찰되었다(Table 4).

#### IV. 고 찰

1972년 Nelson 팀이 DNA 복제과정동안 돌연변이율이 증가되면 암화과정이 야기될 것이라는 가설을 제시한 후<sup>9)</sup> 이에 대한 활발한 연구가 행해져 왔다. 그 결과 대부분의 고형종양이 발생하기 위해서는 종양관련 유전자들에서 점진적인 유전적 변이의 축적이 필요하며, 이러한 변화는 세포의 성장과 발육을 조절하는 기능의 변화를 초래하여 선택적으로 종양세포가 주위세포에 비하여 빠르게 성장하여 종양의 형성을 초래하게 될 것이라고 일반적으로 알려져 있다.

1993년 HNPCC 환자의 염색체 2p15~16에 위치하는 유전자<sup>10,11)</sup>를 초기에는 종양억제 유전자로 생각하였으나, 대립형질의 소실이 아닌 새로운 대립형질의 추가가 관찰되어 복제과정에서의 실수에 의한 것으로 알려지게 되면서 암화 과정과 DNA 상에서의 돌연변이간의 상관관계를 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이러한 유전자의 불안정성은 DNA mismatch repair (MMR)에 관여하는 유전자의 돌연변이나 다른 기전에 의하여 복제과정의 실수를 수정할 수 없을 때 자주 일어나게 될 것이다<sup>12,14)</sup>. Microsatellite는 반복되는 mono-, di-, tri-, tetranucleotide repeat로서 복제과정시 DNA의 한쪽 strand의 미끄럼 현상이 발생하여 heteroduplex를 형성하여 이 repeat 단위들이 확장 또는 축소되어 MSI를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>9)</sup>. Microsatellite는 전체 염색체에 걸쳐 대량으로 분포하며 그 길이, 염기서열 등이 극도의 다양성을 보이고 또한 PCR을 이용하여 쉽게 검출된다는 점 등으로 인간 genome 연구에 있어 차세대 linkage map의 marker로 유용하게 사용되고 있다. 최근에는 다양한 고형종양에서 MSI 현상이 보고되고 있으므로 종양의 과 돌연변이에 대한 지표로 생각할 수 있을 것이다<sup>16)</sup>.

p53 단백질은 정상세포에서는 핵 내에서 매우 낮은 수준으로 발현되며 반감기도 20~30분 정도로 아주 짧기 때문에 통상적인 면역조직화학법에서는 검출이 되지 않는다. 그러나 missense mutation이 일어날 경우 반감기도가 증가하며 단백질의 양도 증가되어 면역조직화학법에 의해 쉽게 검출된다. 그렇지만 결손이나 nonsense 혹은 frameshift mutation에 의해 단백질의 양이 작아진 경우에는 검출되지 않는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>.

OSCC에서 p53유전자의 돌연변이양상은 G : C→A : T 전이가 가장 많으며 다른 종양에 비해 G : C→C : G 전환도 많이 보고되고 있다<sup>18,19)</sup>. 후두암과 인두암의 경우 돌연변이율이 34%로 상대적으로 낮게 나타났으며, 돌연변이양상도 폐암과 유사하게 G : C→T : A 전환이 가장 많았으며 G : C→A : T 전이도 관찰되었다. 구강암의 경우 81%의 돌연변이율을 보였으며 G : C→A : T 전이, A : T→G : C 전이, 결손, 삽입의 형태로 다양하게 나타났다<sup>20)</sup>. 이러한 차이는 각 부위별로 흡연 시 작용하는 종양유발인자가 다르거나 활성기전이 다를 수 있으며, 또한 손상된 DNA를 수복하는 기전의 차이에 의한 것으로 생각할 수 있다.

본 실험에서는 구강 편평상피세포암 환자 17례를 대상으로 microsatellite 불안정성, p53 유전자의 돌연변이 및 이 단백질의 과발현 여부를 조사하였다. 그 결과 p53 단백질은 6례(35%)에서

등급1 이상의 과발현이 관찰되었다. 기존의 연구에서는 51%~85%까지 양성반응을 보인 것과는 달리<sup>21,23)</sup> 본 연구에서는 비교적 낮게 나타났다. p53 면역조직화학적 검사결과와 구강암의 위치와는 아무런 연관성이 없다는 점은 기존의 보고와 일치하였다<sup>23)</sup>. p53에 대한 면역조직화학적 검사 결과와 돌연변이 유·무는 직접적인 연관성이 없었다. 최근의 연구에서도 p53 면역조직화학적 검사 결과는 precancer에서 cancer 단계로 전환되는 시점에서 가장 높은 양성률을 나타내며<sup>25)</sup> 특히 이것은 p53 유전자의 직접적인 돌연변이 유·무보다는 high FAL(Fraction Allelic loss) score와 더 연관이 있으며 이는 즉 genomic stress의 진행을 의미할 뿐 임<sup>26)</sup>을 뒷받침해 주는 결과이다.

K3 환자의 경우 exon 7의 248번 codon에서 missense mutation이 일어났는데 이 위치에는 자주 메틸화되는 CpG dinucleotide가 위치해 있어서 다른 암 중에서도 hot spot으로 알려져 있다<sup>27,29)</sup>. K6 환자의 경우 exon 5의 159번 codon에서 1bp의 결손과 exon 7의 247번 codon에서 4bp의 삽입이 일어나 결과적으로 missense mutation이 일어났을 것으로 추정된다. K8의 경우에는 exon 8의 codon 287 아미노산이 바뀐 결과 단백질의 안정성이 증가하여 면역조직화학적 검사에서 양성으로 나타난 것으로 보인다.

K4, K5 환자는 염기서열 분석결과 exon 5의 136번 codon에서 nonsense mutation이 일어나거나, 또는 다른 codon에서의 삽입, 결손 및 splicing miss로 인하여 결과적으로 불완전한 p53단백질이 만들어져 과발현이 관찰되지 않은 것으로 생각된다. K10 환자의 경우 유전자의 돌연변이가 전혀 없었음에도 불구하고 과발현이 나타났는데, 이는 바이러스 유래 단백질이나 다른 세포성 단백질이 p53 단백을 안정화하였거나 또는 어떤 genotoxic agents에 의해 DNA가 손상을 입은 것으로도 추측할 수 있다<sup>13)</sup>. MSI가 관찰되었음에도 p53 단백질의 과발현 및 돌연변이가 관찰되지 않은 이유는 면역조직화학법에 이용된 항체가 이들 시료에 부적합하였을 가능성을 생각할 수 있고, 두번째로 PCR-SSCP 분석에 이용된 exon 5-8 이 외의 유전자에서 돌연변이가 일어난 경우도 고려해야 할 것이다. 그러므로 p53 exon 4, 9, 10에서의 돌연변이에 대해서도 조사할 필요가 있으며, 또한 다른 종양관련유전자들의 변이에 대한 연구도 따라야 할 것으로 생각된다.

MSI를 wide spread와 low-rate로 나누지 않고 분석한 기존의 연구에서는 42%~55% 정도의 빈도로 MSI가 관찰되었는데 본 연구에서도 이와 비슷한 양상으로 나타났다. 그런데 TGF- $\beta$ R2에 대해서는 전혀 MSI가 나타나지 않았으며, 이는 한국인 위암의 20~25%에서 TGF- $\beta$ R2의 MSI가 관찰된 것과는 차이가 많았다<sup>30)</sup>. 다른 marker에 비해 DCC의 경우 MSI 빈도가 높았는데 기존의 연구에서도 SCC cell line에서 이 유전자의 tumor suppressor 기능이 확인되었으며<sup>31)</sup>, 또한 여러 종양에서 이 유전자의 발현이 감소되는 것으로 발표<sup>32)</sup>된 사실을 감안할 때 DCC는 구강암의 발생에도 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 한편 p53유전자에 돌연변이가 일어난 7례중 5례에서 17p13 근처의 D17S261, D17S513, D17S796 그리고 TP53에서 MSI가 관찰되었는데 이는 p53 유전자의 돌연변이와 그 부근의 MSI가 연관이 있음을 암시한다. 결과적으로 MSI는 기존의 결과에서처럼<sup>23,24,33)</sup> 종양의 위치, 전이여부 등의 병리학

적 특징과는 무관한 것으로 나타났다.

MSI-H는 DNA mismatch repair gene의 결함에 의해 나타나는 현상으로 알려져 있지만, MSI-L은 이와는 달리 유전과정에서의 단순한 돌연변이로 인해 나타나는 현상으로 추정되는 바<sup>30)</sup> MMR-표현형에 영향을 미치는 것은 MSI-H인 것으로 알려져 있다. 구강암의 발생에 흡연이 중요한 원인이 되는 것으로 추정되고 있지만 아직 이를 뒷받침할 만한 확실한 해석은 이루어지지 않고 있다. 본 실험에서는 남자 구강암 환자 12명 중 10명(83%)이 20년 이상의 흡연자이지만 이와 p53 IHC, 임파절로의 전이 등과 직접적인 연관성이 없었으며, 또한 MSI-H는 3례(27%)인 점을 고려할 때 흡연이 직접적으로 유전자 불안정성에 관여한다고 보기는 힘들다. 또한 비흡연자 중 1례에서도 MSI-H, p53 양성반응이 나타난 바 흡연과 구강암의 관계를 단정하기에는 많은 어려움이 있다. 그러나 MSI-L의 경우 사용된 marker 수에 따라 그 발생빈도에 큰 차이가 있으므로 MSI-L은 사용된 marker에 대한 돌연변이율을 비교하는 것이 더 정확한 것으로 알려져 있으며, 특히 담배연기가 genotoxic agent의 작용을 한다는 기존의 연구결과를 고려할 때 MSI-L의 돌연변이 비율과 흡연간에 어떤 관련이 있는지를 조사하였다. 그 결과 MSI-L에 속하면서 흡연을 하지 않는 경우 돌연변이율은 1/12(8.3%)이었으며, 흡연을 하는 경우는 10/44(22.7%)로 나타나 두 값에 많은 차이가 있음을 확인하였다(P=0.42). 즉 흡연은 MSI-H의 발생과는 직접적인 관련이 없을 지라도 돌연변이율을 증가시키는 요인으로 작용하는 것을 알 수 있었다. 또한 흡연은 각 개인에 영향을 미치는 방법, 정도에도 많은 차이가 있을 것으로 추정되므로 앞으로 대상을 더 수집하여 흡연과 구강암간의 상관관계에 대한 후속연구가 있어야 할 것이다.

비록 시료의 수와 MSI marker 수가 부족하였으나 p53 단백질의 과발현 조사와 돌연변이 조사를 통하여 구강암에서 p53유전자의 비활성화의 기전의 일부를 규명할 수 있었으며 이러한 사실은 p53유전자의 돌연변이가 구강암의 병인에 중요한 역할을 하리라는 사실을 뒷받침 해준다. 또한 시료 수와 MSI marker 수를 더 늘린다면 구강암에서 유전적 불안정성의 기전 및 흡연과의 연관성에 대해서도 밝힐 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 먼저 p53 단백질의 과발현과 이 유전자의 돌연변이 유·무 및 구강암의 위치와는 무관한 것으로 나타났다. MSI는 구강암의 위치, 전이여부 등의 병리학적 특징과는 무관하였다. 흡연은 MSI-H의 발생과는 직접적인 관련이 없을 지라도 돌연변이율을 증가시키는 요인으로 작용하는 것으로 추정되었다.

## V. 요약

본 연구에서는 MSI와 구강암과의 상관관계를 규명하기 위하여 17례의 구강암에 대하여 12종류의 marker를 이용하여 MSI 빈도를 조사하였으며, 동시에 p53단백의 과발현과 유전자 돌연변이 양상에 대해서도 알아보았다. 그 결과 4종류 이상의 marker에 대해서 MSI가 나타나는 widespread MSI의 경우 임상병리학적으로 뚜렷한 특징이 없었다. 또한 흡연과 MSI 빈도간에도 연관성이 없

었으나 흡연은 p53 유전자의 돌연변이를 증가시켜 암화과정을 촉진하는 작용을 하는 것으로 나타났다.

## 참고 문헌

1. Daftary DK, Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Mehta FS.: Oral cancer, vol 2, Cambridge: Cambridge University Press, 1991, 29-63.
2. MacFarlane GJ, Boyle P, Evstifeeva TV, Robertson C, Scully C.: Rising trends of oral cancer mortality among worldwide the return of an old public health problem. *Cancer causes Control* 5: 259-265, 1994.
3. MacFarlane GJ, Boyle P, Scully C.: Oral cancer in Scotland: Changing incidence and mortality. *Brit Med J*. 305: 1121-1123, 1992.
4. Eshleman JR, Markowitz SD.: Mismatch repair defects in human carcinogenesis. *Hum Mol Genet*. 5: 1489-1494, 1996.
5. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoiike A, Osifchin NE, Robbins PD, Sakai T.: CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene* 8: 1063-1067, 1993.
6. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D.: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med.* 1: 686-692, 1994.
7. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa J-PJ, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB.: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 55: 4525-4530, 1995.
8. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S.: A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58: 5248-5257, 1998.
9. Nelson RL, Mason HS.: An explicit hypothesis for chemical carcinogenesis. *J. Theor. Biol.* 197-200, 1972.
10. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R.: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038, 1993.
11. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti.: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215-1225, 1993.
12. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkama L, Mecklin JP, Jarvinen, Powell SM, Jen J, Hamilton SR.: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816, 1993.
13. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M.: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature(Lond.)* 363: 558-561, 1993.
14. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D.: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819, 1993.
15. Nelson DL, Warren ST.: Trinucleotide repeat instability: when and where?. *Nat. Genet.* 4: 107-118, 1993.
16. Loeb LA.: Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 54: 5059-5063, 1994.
17. Hall PA, Lane DP.: p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? revised. *J Pathol.* 172: 1-4, 1994.
18. Habuchi T, Takahashi R, Yamada H.: Influence of cigarette smoking and schistosomiasis on p53 gene mutation in urothelial cancer. *Cancer Res.* 53: 3795-3799, 1993.
19. Spruck CH, Rideout WM, Olumi AF, Ohneseit PF, Yang AS, Tsai YC, Nichols PW, Horn T, Herman GG, Steven K, Ross RK, Yu MC, Jones PA.: Distinct pattern of p53 mutations in bladder cancer: relationship to tobacco usage. *Cancer Res.* 53: 1162-1166, 1993.



20. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC.: Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *cancer Res.* 54: 4855-4878, 1994.
21. van Heerden WF, van Rensburg EJ, hemmer J, Raubenheimer EJ, Engelbrecht S.: Correlation between p53 gene mutation, p53 protein labeling and PCNA expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 237-240, 1998.
22. Rich AM, Kerdpin D, Reade PC. p53 expression in oral precancer and cancer. *Aust Dent J.* 103-105, 1999.
23. Partridge M, Emilion G, Falworth M, Hern RA, Phillips E, Pateromichelakis S, Langdon J.: Patient-specific mutation databases for oral cancer. *Int J Cancer.* 84: 284-292, 1999.
24. Ng IO, Lam KY, Ng M, Regezi Ja.: Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas-correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol.* 35: 63-69, 1999.
25. Murti PR, Warnakulasuriya KA, Johnson NW, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS.: p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J. Oral Pathol Med.* 5: 191-196, 1998.
26. Partridge M, Kiguwa S, Emilion G, Pateromichelakis S, A' Hern R, Langdon JD.: New insights into p53 protein stabilization in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 35: 45-55, 1999.
27. Ehrlich M, Chang XY, Inamdar NM.: Spontaneous deamination of cytosine and 5-methylcytosine residues in DNA and replacement of 5-methylcytosine residues with cytosine residues. *Mutat Res.* 238: 277-286, 1990.
28. Holliday R, Grigg GW.: DNA methylation and mutation. *Mutat Res.* 285: 61-67, 1993.
29. Rideout WM III, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA.: 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249: 1288-1290, 1990.
30. Chung YJ, Song JM, Lee JY, Jung YT, Seo EJ, Choi SW, Rhyu MG.: Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Res.* 56: 4662-4665, 1996.
31. Klingelhutz AJ, Hedrick L, Cho KR, McDougall JK.: The DCC gene suppresses the malignant phenotype of transformed human epithelial cells. *Oncogene* 10: 1581-1586, 1995.
32. Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, Walsh MD, Bates P, Simmons DL, Antalis TM.: The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 13: 787-795, 1996.
33. Shibata D, Navidi W, Salovaara R, Li ZH, Aaltonen I.: A somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat Med.* 2: 676-681, 1996.